

토끼의 하악골에서 β -TCP와 rhBMP-2의 골형성 효과에 대한 형태계측학적 연구

김규남 · 양정은 · 장재원 · 사시카라 바라라만 · 왕 봉 · 김일규
인하대학교 의과대학 부속병원 구강악안면외과

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:161-71)

Morphometric analysis on bone formation effect of β -TCP and rhBMP-2 in rabbit mandible

Kyu-Nam Kim, Jung-Eun Yang, Jea-Won Jang, Balaraman Sasikala, Wang Beng, Il-Kyu Kim

Department of Oral and Maxillofacial surgery, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Introduction: This study was to assess the effectiveness of new bone formation and regeneration by using a rhBMP-2 and β -TCP as a carrier in rabbits' mandible.

Materials and Methods: The mandibles of 36 rabbits were exposed and cortical bone was penetrated for this study. The experimental subjects were divided into 3 groups each 12 rabbits ; control group, experimental group 1, and experimental group 2. Control group had the defect itself without any treatment, in the experimental group 1, β -TCP only was grafted, and in the experimental group 2, rhBMP-2 soaked in β -TCP was grafted.

The rabbits were sacrificed after 1, 2, 3, 4, 6, and 8 weeks, and new bone formation area was examined and measured for bone quantitative and qualitative analysis with light, fluorescent and polarized microscopy.

Results: In the experimental group 1, new bone formation from the adjacent host bone was made by osteoconduction, and in the experimental group 2, direct new bone formation by osteoinduction of rhBMP-2 as well as new bone formation by osteoconduction of β -TCP were observed.

Conclusion: rhBMP-2 of experimental group 2 is very effective in the bone formation in early 2 weeks and bone remodelling from 3 weeks.

Key words: Bone morphogenetic protein, Tricalcium Phosphate (TCP), Osteoconduction, Osteoinduction

(원고접수일 2010.3.10 / 1차수정일 2010.4.6 / 2차수정일 2010.4.22 / 게재확정일 2010.5.4)

I. 서 론

발치 또는 치주질환, 외상, 종양, 노화 등 여러 가지 원인으로 치아 상실과 더불어 치조골 손실이 동반된 경우, 치조골의 재생이 동시에 시행되거나 선행되어야 기능적 및 심미적 수복을 달성할 수 있다. 이 경우 치조골 재생을 목적으로 여러 가지 골이식술이 사용되고 있다.

그 중 주로 사용되는 방법이 골재생 능력과 생체적합성 및 면역반응에 유리한 자가골을 이식하는 방법이지만, 자가골 이식은 공여 부위의 이식골 채취를 위한 부가적인 수술이 필요하여, 환자의 불편감과 두려움, 수술 시간의 증

가, 감염 가능성, 공여부의 이차적인 흉터 발생 등 합병증이 생길 확률이 높아지고, 이식골의 흡수가 발생할 수 있으며, 충분한 양의 골을 얻지 못하는 경우 등, 많은 한계를 가지고 있다^{1,2}. 또한 동종골의 경우는 자가골의 단점을 보완할 수 있지만 후천성 면역 결핍 증후군의 발생, 오염된 혈액과 조직을 통한 전염 등 공여자로부터 질병이 감염될 가능성을 완전히 배제할 수는 없다³. 이종골의 경우도 입자형태로 골유도 재생술과 병행하여 오랫동안 골 결손 부위의 회복, 상악동 거상술, 치조골 증대술 등에 쓰여 임상적으로 성공적인 결과를 보여주고 있으나, 특이질환 등 다른 종으로부터 교차감염의 가능성이 있다^{4,6}. 합성골의 경우 생체친화성이 있고, 교차감염의 우려가 없으며, 무한 공급이 가능하나, 성장인자나 골형성 촉진인자 등 골재생을 촉진하는 요소를 함유하고 있지 않다. 그러므로 직접 골형성을 일으키기보다는, 골형성 세포가 기능할 수 있는 생체적 환경을 조성하는 지지체(scaffold)의 역할을 하게 된다. 따라서 기존의 골이식재를 대체하거나, 골이식재의 골재생 효과를 더욱 증진시킬 수 있는 물질들에 관심이 높아지고 있다.

김 일 규

400-711 인천광역시 중구 신흥동 3가 7-206
인하대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

Il-kyu Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry,
College of Medicine, Inha University
#7-206, 3rd St. Shinheung-Dong, Choong-Gu, Incheon, 400-711, Korea
TEL: +82-32-890-2470 FAX: +82-32-890-2475
E-mail: kik@inha.ac.kr

이렇게 골이식술에 사용되는 여러가지 기존 술식의 단점을 극복하고자, 골 형성 촉진을 위한 신호전달물질(Signaling Molecule)을 이용한 기초 연구와 임상적 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 중 하나가 BMP(골형성단백질; Bone morphogenetic protein)를 이용한 연구이다^{7,8}. BMP는 1965년 Urist⁹가 탈회된 골기질에서 골유도 능력이 있는 단백질을 추출하여, 이를 BMP라 명명한 이래, 현재까지 최소 20여 종류 이상이 밝혀졌으며, 1988년 Wozney¹⁰가 rhBMP(재조합 인간 골형성 단백질; recombinant human Bone morphogenetic protein)를 합성한 이래, 재조합 유전자 기술의 발달로 골유도 능력을 갖고 있는 다양한 rhBMP를 생산할 수 있게 되었다.

BMP는 다능성 중배엽 세포(multipotential mesenchymal cell)가 골-연골성(osteochondrogenic)과 전구골모세포(osteoblast precursor cell)로 분화를 유도하여 연골형성, 골형성과 골의 개조 및 골격과 관련된 결합조직 등의 형성에 관여한다¹¹.

BMP-2부터 BMP-8까지는 TGF- β (Transforming growth factor- β)의 상과(Superfamily)에 속하는 이량체 분자이며, BMP 중에서 BMP-2와 BMP-3가 가장 활성이 뛰어난 것으로 여겨지고 있다. 또한 BMP-7은 osteogenic protein-1 (OP-1)으로, BMP-2와 함께 골형성을 유도시키는 능력이 있다고 보고되었다. BMP-2는 골표지자(bone marker) 유전자의 발현을 상향 조절하고, alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 증가시키므로써, 조골모세포 형질(phenotype)로의 계통적 발전(lineage progression)을 향상시키며, 또한 골유도 및 재생의 강력한 신호전달물질로, 구강악안면 영역에서 실험적, 임상적으로 모두 홀륭한 골 형성 효과를 보이고 있다^{12,13}.

하지만 BMP는 수용성이며 반감기가 짧으므로, 임상적으로 단독 사용시 이식 부위에 BMP의 유지와 계속적인 분비가 매우 어렵다¹⁴. 따라서 유지, 분비를 위한 적절한 매개체(Carrier)가 필요하며, 매개체의 조건으로는 첫째, 생체친화성(biocompatibility)이 높고, 독성(toxicity), 면역원성(immunogenicity) 및 발암성(carcinogenicity)이 없어야 하며, 둘째로 BMP의 골재생능력(bone repair capability)과 골형성 능력(bone formation capability)을 방해하지 않고, 셋째로 쉽게 제작, 구입할 수 있고, 가공 및 성형이 용이해야 하며, 골형성과 함께 흡수되어 소실되거나, 골과 일체화를 이를 수 있어야 한다^{15,16}. 이러한 매개체로 TCP (Tricalcium Phosphate), HA (Hydroxyapatite), 흡수성 교원질(Absorbable collagen sponge), bovine bone mineral (BBM), synthetic biodegradable polymer, demineralized bone matrix (DBM), bovine deorganized crystalline bone matrix (Bio-Oss), poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles (PLGA), and poly-lactic acid granules (Drilac) 등이 보고 되어왔다¹⁷⁻¹⁹. 그 중 β -TCP는 무균 상태의 합성재료로, 혈액 및 조직 등을 매개로 하는 감염의 위험을 피할 수 있는 인공의 생체친화성 골대체 재료로 소개되어왔다.

이에 본 연구에서는 국내에서 개발된 β -TCP와 rhBMP-2를 토끼의 하악골에 이식한 후, 시간 경과에 따른 신생골 형성 및 골개조의 효과를 시기별로 평가하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

본 연구에 사용된 이식재는 β -TCP(코웰메디, 한국)과 rhBMP-2(코웰메디, 한국)이고(Table 1), 하악골 골체부의 골결손부 형성을 위해 사용한 기구는 내경 5 mm, 외경 6 mm의 관상톱(trephine bur, 3i Co. USA)을 사용하였다.

실험동물은 체중 3.0 kg 내외의 36마리의 건강한 웅성뉴질랜드 토끼(New Zealand, White Rabbits)를 사용하였으며, 고형 사료와 분리된 실내 사육실 등 동일한 조건 하에서 사육 환경의 적응 기간을 거쳐서 건강상태의 이상 유무를 살핀 후 실험에 사용하였다.

β -TCP와 rhBMP-2의 유효성을 판별하기 위해 결손부위만 형성하고 아무것도 적용하지 않은 군을 대조군으로, β -TCP만을 적용한 군을 실험1군, β -TCP에 rhBMP-2를 흡수시켜 적용한 군을 실험2군으로 각각 설정하고, 대조군, 실험1군 및 실험2군 모두 각각 12마리씩 구분하고, 토끼 한 마리 당 하악골의 골체부 협축 두 부위 씩 24곳을 실험 부위로 설정하였다.(Table 2)

인하대학교 생명과학연구소의 관리 지침을 준수하여 연구소 내 수술실에서 모든 실험을 진행하였으며, 인하대학교 의과대학 실험동물위원회(Committee for the Care and Use of Laboratory Animals)의 방침 및 동물실험 관련 법규를 준수하였다.

실험동물은 전신 마취를 위하여 동물용 진정, 근육이완제인 2% Xylazine HCl (Rompun, 10 mg/kg, 바이엘코리아, 한국)과 전신 마취제 콜레탈(Vibac, 0.2 ml/kg, France)을 근육 주사하고, 부가적으로 출혈 감소와 국소 마취를 위해

Table 1. List of used graft materials

Material	Manufacturer
β -TCP	Cowellmedi Co. Korea
rhBMP-2	Cowellmedi Co. Korea
$(\beta$ -TCP; β -tricalcium phosphate, rhBMP-2; recombinant human bone morphogenetic protein-2)	

Table 2. Number of experimental animals in this study

Experimental groups	Number of Rabbits	Site
Control group (defect only)	12	24
Experimental group 1 (β -TCP only)	12	24
Experimental group 2 (rhBMP-2/ β -TCP)	12	24
$(\beta$ -TCP; β -tricalcium phosphate, rhBMP-2; recombinant human bone morphogenetic protein-2)		

1:100,000 epinephrin을 함유한 2% lidocaine HCl (유한양행(주), 한국)을 수술 부위에 피하 주사하였다. 토끼의 하악골 부위를 제모하고 베타딘으로 소독한 후 무균적 조건하에서 수술을 시행하였다. 토끼의 하악골 하연 부위를 #15 수술도를 이용하여 절개하고 전층 판막을 거상하여, 하악골 골체부 협측 면의 중앙 부분을 노출시켰다. 노출된 면에 관상톱을 사용하여 충분한 양의 생리식염수로 주수하면서, 각각 직경 6 mm, 깊이 2-3 mm의 원형 결손부를 두 개씩 형성하였다.(Fig. 1)

대조군은 원형 결손부에 아무런 처치 없이 거즈로 압박지혈하고, 판막을 원래 위치에 고정시킨 후 4-0 black silk 봉합사로 봉합하였고, 실험1군은 β -TCP를 이식하고 봉합하였으며, 실험2군은 rhBMP-2를 흡수시킨 β -TCP를 이식하고 봉합하였으며, 술 후 동통 감소와 감염 방지를 위해 모든 토끼에게 Danpuron (진통제) (화성동물약품, 한국) 0.3 cc와 코리마이신(항생제) (한일약품공업, 한국) 0.3 cc를 근육 주사하였다.

1) rhBMP-2와 β -TCP의 적용

실험1군의 원형 결손부 한 곳 당 β -TCP 0.18 g을 이식하였으며, 실험2군은 β -TCP 0.18 g에 rhBMP-2 20 μ g을 흡수시켜서 이식하였다.

2) 표본 제작 과정 및 조직형태학적 분석

탈회 표본 제작을 위하여 실험동물들을 술후 1주, 2주, 4주, 6주 후에 각각 2마리씩 희생시킨 다음 하악골을 떼어낸 후 경조직 절단기로 수술 부위의 조직 절편을 채득하였다.

채득한 조직 절편은 70% 에틸 알코올로 충분히 고정시키고, 흐르는 물로 세척한 후, 10% neutral formalin으로 단백

질을 고정하고, 5% 질산용액에 5일간 탈회를 거쳐 파라핀에 포매한 다음, 최종적으로 하악골의 수평 단면(transverse section) 방향으로 3 μ m 두께로 잘라서, hematoxylin and eosin (H-E)으로 염색하였다. 광학 현미경 하에서 조직학적인 소견을 관찰하고, 염색된 조직 슬라이드를 연구용 현미경에 부착된 디지털 카메라를 이용하여 Spot advanced program (올림푸스, 일본)으로 사진 촬영하였다.(Fig. 2) 대조군, 실험1군 및 실험2군, 각각의 토끼에서 2장 씩의 조직 슬라이드를 제작하고, 실험 부위 중앙의 현미경사진 100배율에서 임의로 4곳씩 선정하여 계측하였으며, 100배율 슬라이드 사진의 크기는 1.160 mm × 0.880 mm (1.0208 mm²) 이었으며, 각 주당 각군의 16곳을 (주)아이엔지 플러스사의 Image Pro Plus 4.0 프로그램을 이용하여 슬라이드 사진에서 새로운 골조직 형성 면적을 측정하고 평균값을 구하였다.

또한 술후 3주와 8주의 실험동물들은 형광 및 편광 현미경 분석을 위하여, 희생 하루 전 calcein blue를 정맥 주사하였으며, 비탈회 표본 제작을 위하여 3주와 8주에 2마리씩 희생시킨 다음 하악골을 떼어낸 후 경조직 절단기로 수술 부위의 조직 절편을 채득하였다.

채득한 조직 절편은 Villanueva bone stain 용액에 침적하여 염색시킨 후 통법에 따라 에탄올에 단계별로 탈수를 하였다. 탈수된 조직 절편을 methyl methacrylate 레진에 포매하여 37.5°C에서 30일간 경화시킨 후, 경조직 절단기 (Crystal cutter/diamond wheel; Maruto Co, Japan)로 하악골의 수평 단면 방향으로 절단하여 300 μ m 크기의 절편으로 제작하고, 경조직 연마기(Grinding machine, Maruto Co, Japan)를 사용하여 100 μ m의 절편으로 줄인 후 수작업으로 20-30 μ m까지 연마하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 얻어



Fig. 1. Circular defect form in rabbit's mandible.

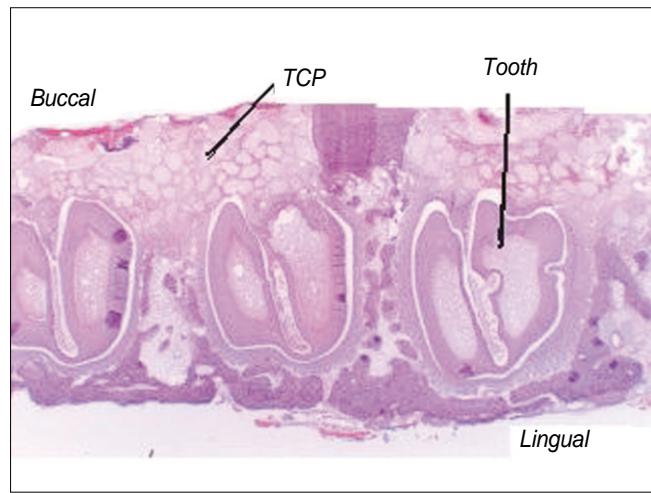


Fig. 2. Photomicrographs of the histological section seen by light microscopy. (original magnification x10)
(TCP: β -tricalcium phosphate)

진 조직 슬라이드를 형광 및 편광 현미경으로 검경하고 분석하였다.

III. 결 과

1. 재생된 골조직의 조직형태학적 소견

대조군은 1주차와 2주차에서 혈액 및 섬유조직으로만 구성되어 있었으며 골형성을 관찰할 수 없었고, 4주, 6주차에서는 새로운 골조직 생성이 관찰되며 점진적인 석회화를 보였다. 실험1군 및 실험2군은 1주차에서 골이식재로 차 있는 것이 관찰되었으며, 2주차에서는 골이식재 주위에 골모세포(osteoblast)가 둘러싸여 있으며 적은 양의 새로운 골조직 형성이 관찰되었고, 골이식재 주변에는 파골세포(osteoclast)에 의한 골이식재의 흡수 소견이 관찰되었다. 4주와 6주차에서 골이식재 주변에는 골세포(osteocyte)가 새로 형성된 골기질에 둘러싸인 양상으로 골조직 생성 및 석회화가 점차적으로 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 3)

실험1군 및 실험2군은 대조군에 비하여 골형성이 1주 정도 빨리 진행되었고, 대조군과 두 그룹의 실험군 모두에서 2주에서 4주, 6주로 가면서 골조직의 형성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 실험2군은 실험1군에 비하여 4주, 6주에서 성숙한 골조직에서 관찰되는 골기질(bone matrix)의 층판구조(lamellae)가 더 잘 관찰되었다.(Fig. 4)

또한 실험1군에서 골형성의 양상은 주위 골조직으로부터 골이식재로의 방향으로 점차적으로 형성되는 골전도(osteocondution) 현상을 보인 반면, 실험2군에서는 골조직

으로부터 골이식재로의 방향으로 점차적으로 형성됨과 동시에, 골이식재 주위에서부터 직접 새로운 골조직이 생성되는 골유도(osteoinduction) 현상이 관찰되었다.

2. 재생된 골조직 정량분석

새로 생성된 골조직 정량분석은 대조군, 실험1군 및 실험2군의 조직사진을 이용하여 진행하였으며, 현미경사진 100배율 되는 부위를 임의로 4곳을 선정하여 각 주당 각군의 16곳을 정량 분석하였다. 조직사진의 크기는 $1.160\text{ mm} \times 0.88\text{ mm}$ (1.0208 mm^2) 였다.(Figs. 5, 6)

대조군은 1주차, 2주차에서는 혈액 및 섬유조직으로만 구성된 것이 관찰되었고, 골형성을 관찰할 수 없었으며, 4주차에서 $15.04 \pm 2.18\%$ ($0.15 \pm 0.02\text{ mm}^2$), 6주차에서는 $22.73 \pm 2.38\%$ ($0.23 \pm 0.02\text{ mm}^2$)가 생성되었다.

실험군은 1주차에서 두 그룹 모두 골이식재만 관찰되고 새로운 골조직 형성은 관찰되지 않았으며, 실험1군은 2주차에서 $1.29 \pm 0.9\%$ ($0.01 \pm 0.01\text{ mm}^2$), 4주차에서는 $19.28 \pm 2.95\%$ ($0.20 \pm 0.03\text{ mm}^2$), 6주차에서는 $29.87 \pm 3.52\%$ ($0.30 \pm 0.04\text{ mm}^2$)가 생성되어 점진적인 증가를 보였다. 또한 실험2군에서는 2주차에서 $11.29 \pm 1.04\%$ ($0.12 \pm 0.01\text{ mm}^2$), 4주차에서는 $28.20 \pm 3.79\%$ ($0.29 \pm 0.04\text{ mm}^2$), 6주차에서는 $42.48 \pm 3.18\%$ ($0.43 \pm 0.03\text{ mm}^2$)가 생성되어 점진적인 증가를 보였다.(Table 3)

2주에서 실험1군과 실험2군의 골형성 차이는 8.72배, 4주에서 대조군과 실험1군의 골형성 차이는 1.28배, 대조군과 실험2군의 차이는 1.87배, 실험1군과 실험2군의 차이는 1.46배, 6주에서 대조군과 실험1군의 골형성 차이는 1.31

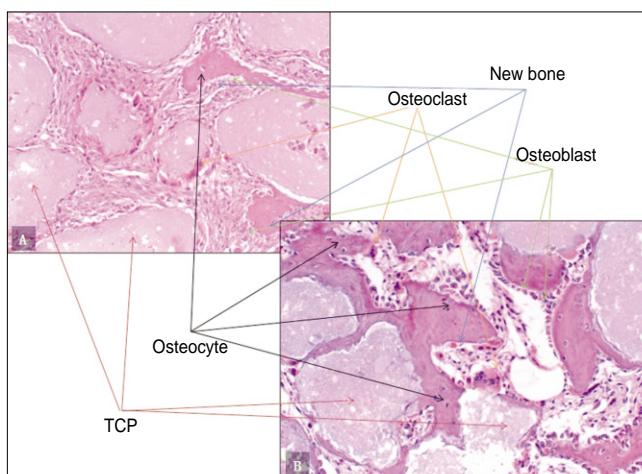


Fig. 3. Photomicrographs of decalcified specimen.(H&E staining) A. Experimental group 1, 2 weeks.(original magnification x200) B. Experimental group 2, 2 weeks.(original magnification x200)
(TCP: β -tricalcium phosphate)

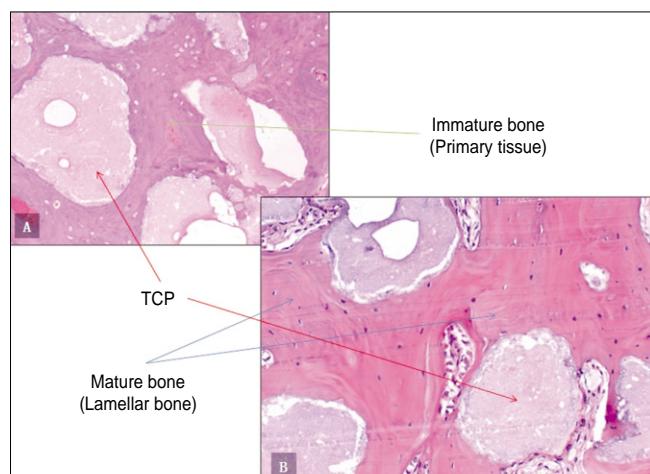


Fig. 4. Photomicrographs of decalcified specimen.(H&E staining) A. Experimental group 1, 6 weeks.(original magnification x200) B. Experimental group 2, 6 weeks.(original magnification x200)
(TCP: β -tricalcium phosphate)

배, 대조군과 실험2군의 차이는 1.87배, 실험1군과 실험2군의 차이는 1.42배 였다.(Fig. 7, Table 4)

각 그룹 간 신생골 면적의 차이를 비교해 보면 대조군과 실험1군의 차이는 β -TCP의 효과로 보여지며 3% 정도의 일정한 간격을 보인 반면, 대조군과 실험2군의 차이는 β -TCP와 rhBMP-2의 동시 효과로 여겨지며 차이가 점차 벌어졌고, 실험1군과 실험2군에서의 차이는 2주 이내에서의 차이가 유지되는 것으로 보아 rhBMP-2의 효과로 인한 차이로 여겨진다.(Table 5)

3. 비탈회 골조직의 형광 & 편광 현미경 소견

1) 형광(fluorescence light) 현미경 소견

신생 골조직 형성 여부를 관찰하기 위하여 형광물질을 주입 후 비탈회 골조직 시편을 제작하여 형광 현미경으로 관찰한 결과, 대조군은 3주 및 8주에서 형광선을 관찰할 수 없었으며, 실험1군의 8주째에서 이식재에 접해 형성된 새로운 골조직에서 calcein blue 염색에 의한 형광선이 산발적으로 보였고, 실험2군에서는 3주째부터 형광선이 희미하게 나타나고, 8주째에는 이식재에 접해 형성된 신생 골조직에서 형광선이 선상으로 출현하는 양상을 보였다. 실험1군에 비하여 실험2군의 3주째 되는 조직에서 골성조직

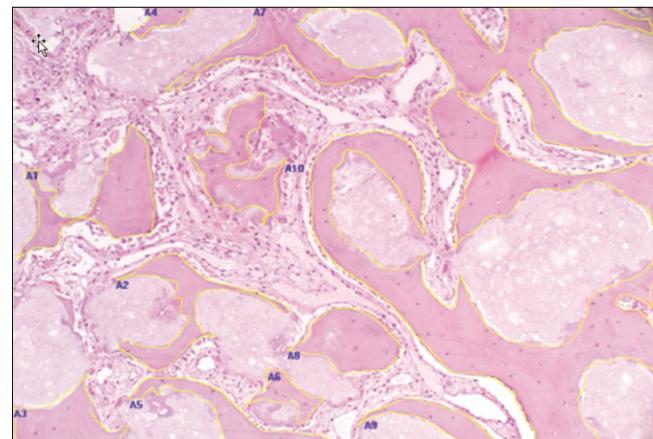


Fig. 5. Quantitative analysis of bone formation at TCP/rhBMP-2 grafts.
(H&E staining, original magnification x100, 4 weeks)
Boundary of new bone formation were marked and calculated with Image Pro Plus 4.0. (A1-A10)
(TCP: β -tricalcium phosphate, rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2)

(osteoid)의 형성이 활발하게 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.(Figs. 8, 9)

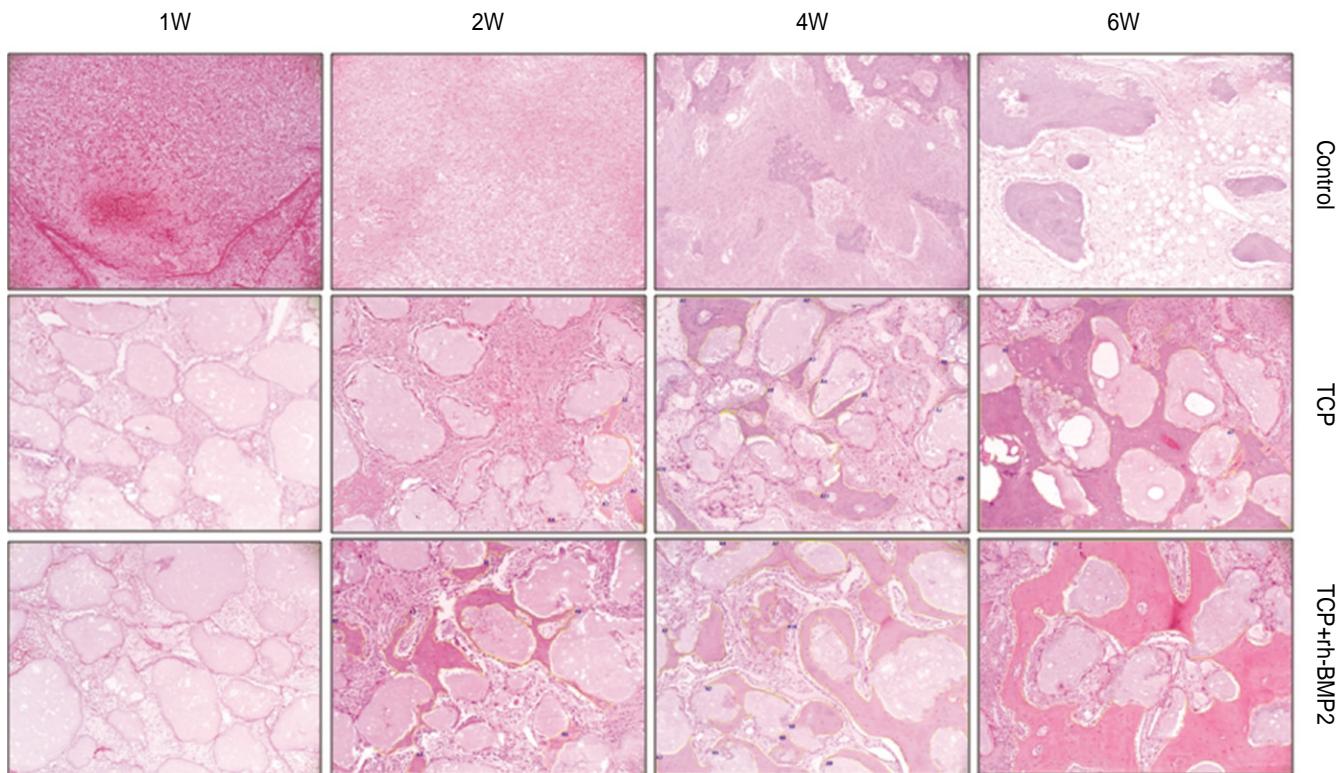
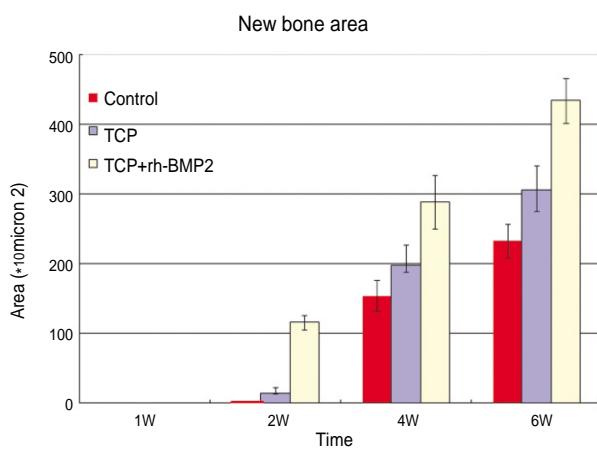


Fig. 6. Quantitative analysis of bone formation at control group (defect only), TCP grafts only and TCP/rhBMP-2 grafts. (H&E staining, original magnification x100)
(TCP: β -tricalcium phosphate, rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2)

Table 3. Quantitative analysis of bone formation area

	Control group (n=16)	Experimental group 1 (n=16)	Experimental group 2 (n=16)
1 Wks	0	0	0
2 Wks	0	1.29±0.9% (0.01321±0.00915)	11.29±1.04% (0.11525±0.01065)
4 Wks	15.04±2.18% (0.15357±0.02223)	19.28±2.95% (0.19683±0.03009)	28.20±3.79% (0.28788±0.03869)
6 Wks	22.73±2.38% (0.23205±0.02433)	29.87±3.52% (0.30494±0.03590)	42.48±3.18% (0.43368±0.03247)

**Fig. 7.** Quantitative analysis of bone formation at control group (defect only), β -TCP grafts only and β -TCP/rhBMP-2 grafts.

(TCP: β -tricalcium phosphate, rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2)

Table 4. Comparative analysis of inter-group differences (Unit: times)

	Cont. vs Exp.1	Cont. vs Exp.2	Exp.1 vs Exp.2
2 Wks	-	-	8.72
4 Wks	1.28	1.87	1.46
6 Wks	1.31	1.87	1.42

(Cont.: control group, Exp.1; experimental group 1, Exp.2; experimental group 2)

Table 5. Quantitative analysis of inter-group bone formation area (Unit: mm², %)

	Cont. vs Exp.1	Cont. vs Exp.2	Exp.1 vs Exp.2
2 Wks	0.01321 (1.3)	0.11525 (11.3)	0.10204 (10.0)
4 Wks	0.04326 (4.3)	0.13431 (13.2)	0.09105 (8.9)
6 Wks	0.07289 (7.1)	0.20163 (19.8)	0.12874 (12.6)

(Cont.: control group, Exp.1; experimental group 1, Exp.2; experimental group 2)

$$\text{Difference of inter - group bone formation area} \quad (\%) = \frac{\text{Difference of inter - group bone formation area}}{\text{Unit Area (1.0208 mm}^2)} \times 100$$

2) 편광(polarized light) 현미경 소견

골조직의 충판구조 즉, 성숙골 관찰을 위해 비탈회 골조직 시편을 제작하고 편광 현미경 검사를 시행하여 일차 골조직(primary tissue) 또는 미성숙골(immature bone)로부터 충판구조(lamellae)로 이루어진 이차 골조직(secondary tissue) 또는 성숙골(mature bone)로의 진행 정도를 관찰하였다.

대조군 및 실험1군에서는 아교섬의 편광에 의한 밝은 충과 어두운 충이 교대로 나타나는 충판구조를 가지는 성숙골은 관찰되지 않았으며, 8주차에서 새로 형성된 골조직 중 일부에서 관찰되었다.

반면에 실험2군에서는 3주차에서부터 일부 골조직에서 충판구조가 관찰되었고, 8주차에서는 새로 생성된 대부분의 골조직에서 성숙골에 나타나는 충판구조가 관찰되었다.(Figs. 10, 11)

IV. 고 칠

합성골이 자가골과 유사한 골유도성(osteoinductivity)과 골전도성(osteoconductivity)을 가지기 위해서는 골형성(osteogenesis)을 유도할 수 있는 BMP의 존재가 필요하다. BMP는 골형성 유도물질로서 골속에 내재해 있으면서 태생기 이후 골성장에 따른 골개조에 관여하다가, 골의 외상이나 질병이 발생하면 다른 성장인자와 함께 골형성을 유도한다.

BMP는 화학주성으로 미분화 간엽세포를 골결손 부위로 유인하고, 연골전구세포 및 골전구세포로의 분화를 유도하면서 이들 세포의 증식에 관여하여, 최종적으로는 연골모세포, 골모세포 및 골세포로 분화가 완료되면서 연골내 골화과정을 통해 신생골을 형성한다. 여러가지 BMP 중 BMP-2, -4군은 다른 종류의 BMP와 성장인자 등에 비하여

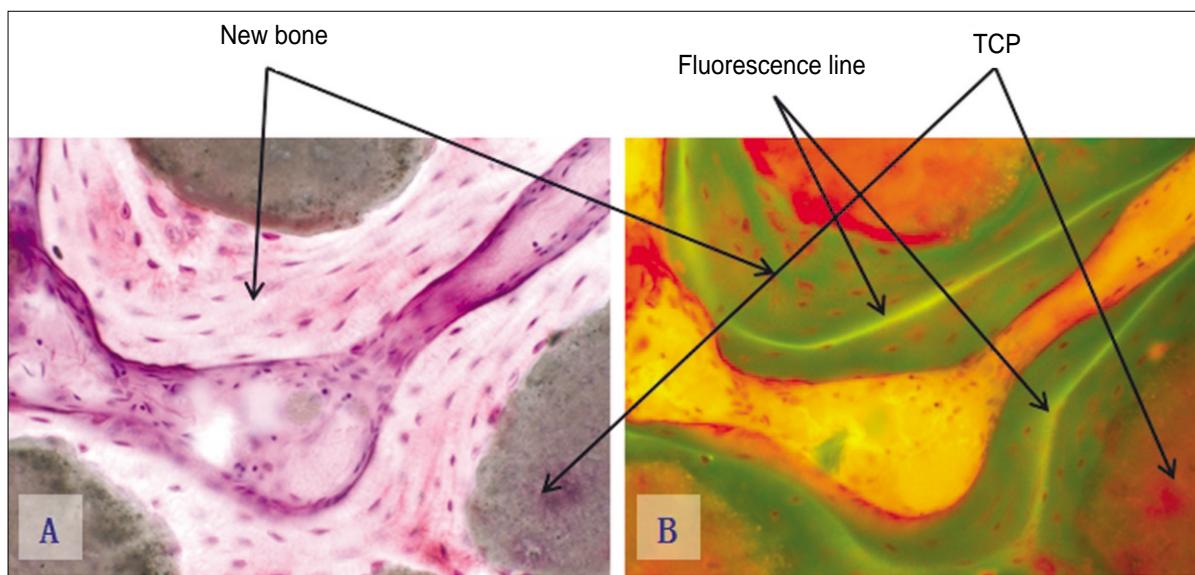


Fig. 8. Photomicrographs of undecalcified specimen.(original magnification $\times 100$) A. Experimental group 2, 8 weeks. (Villanueva bone stain) B. Experimental group 2, 8 weeks.(fluorescence light)
(TCP: β -tricalcium phosphate)

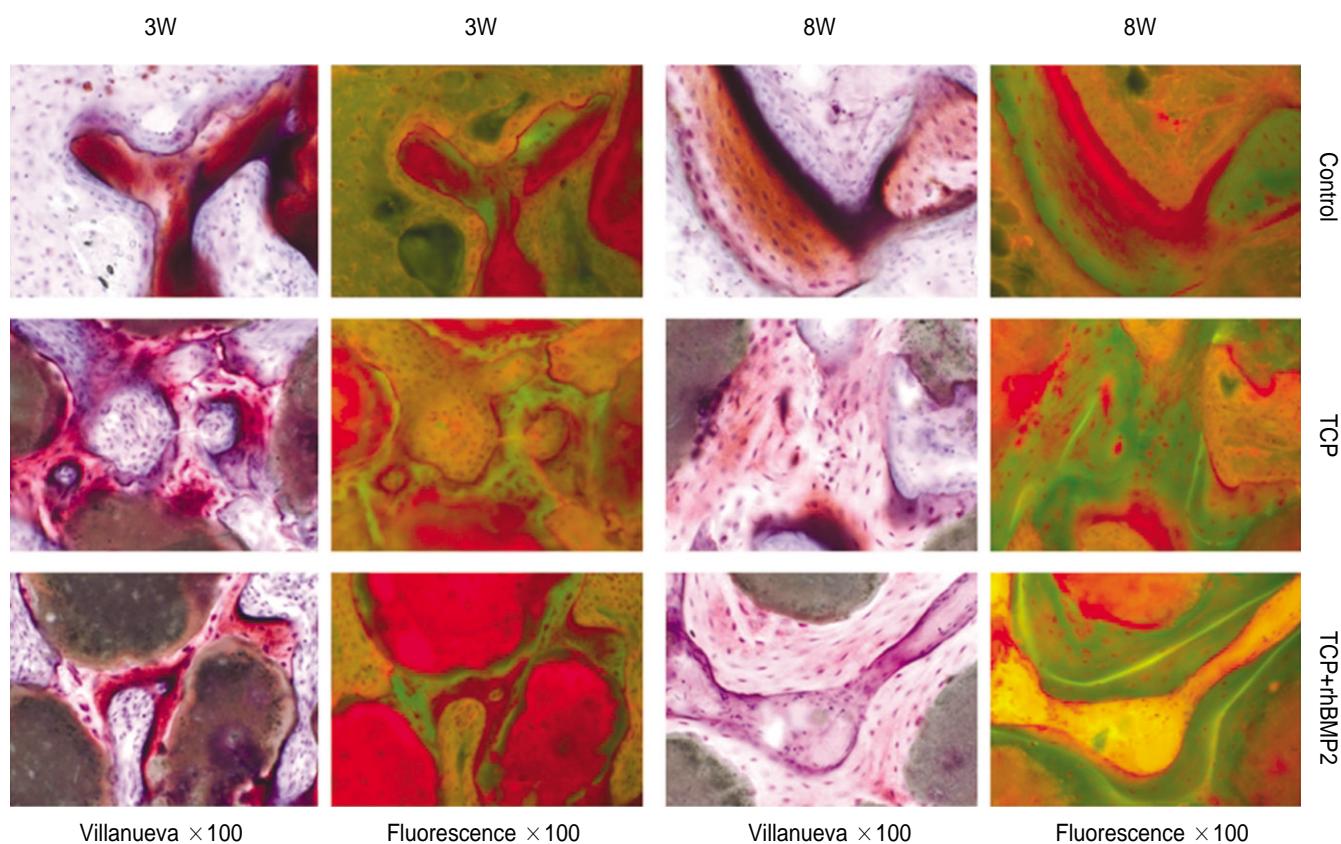


Fig. 9. Comparison of Villanueva bone stain and fluorescence light microscopic photographs of undecalcified specimen at control group (defect only), TCP grafts only and TCP/rhBMP-2 grafts.
(TCP: β -tricalcium phosphate, rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2)

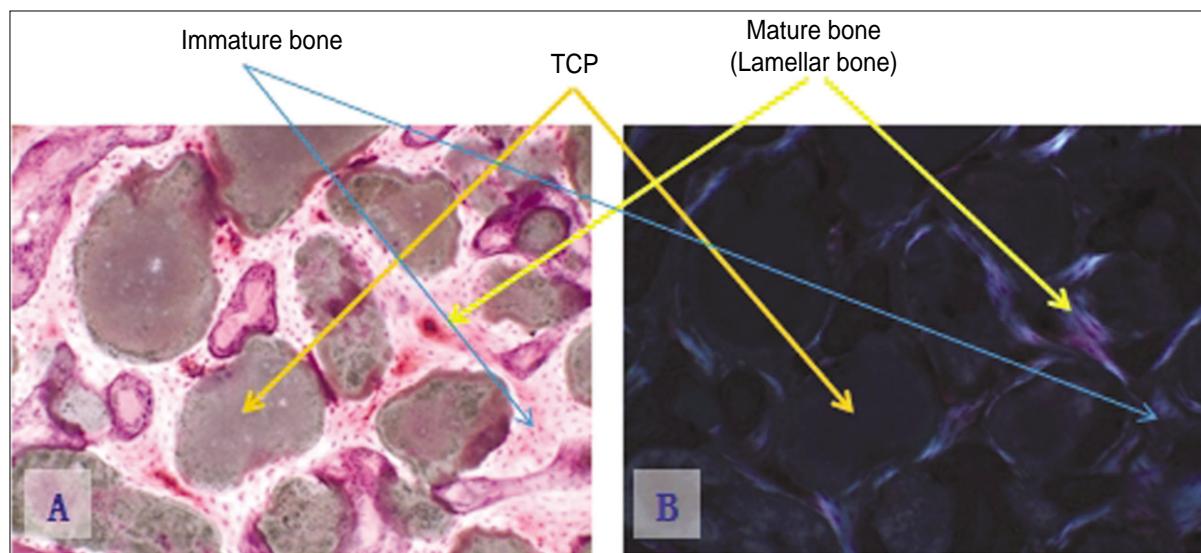


Fig. 10. Photomicrographs of undecalcified specimen. (original magnification $\times 100$)

A. Experimental group 2, 8 weeks. (Villanueva bone stain) B. Experimental group 2, 8 weeks. (polarizing light)
(TCP: β -tricalcium phosphate)

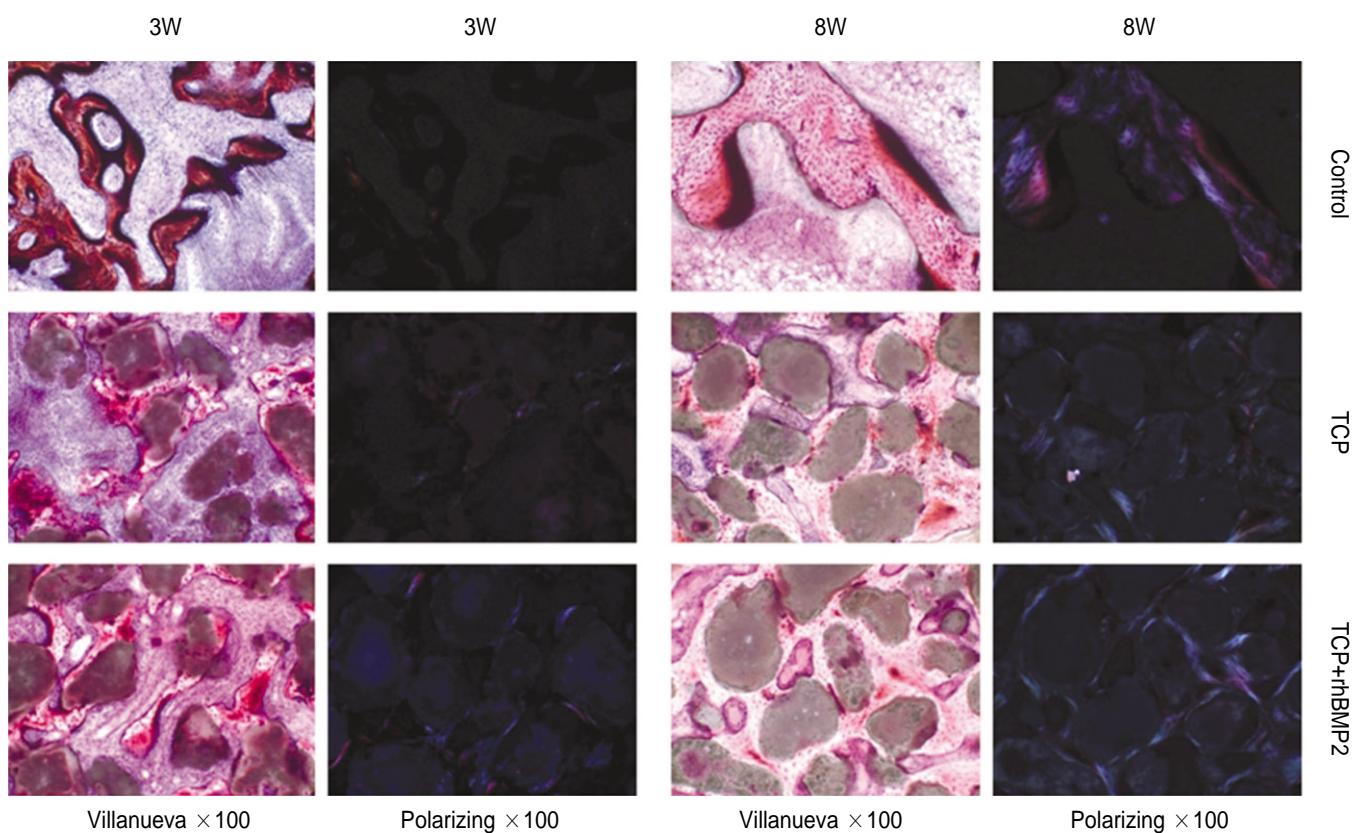


Fig. 11. Comparison of Villanueva bone stain and polarizing light microscopic photographs of undecalcified specimen at control group (defect only), TCP grafts only and TCP/rhBMP-2 grafts.

(TCP: β -tricalcium phosphate, rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2)

유전자 서열이 가장 유사하고, 생체(*in vivo*) 및 시험관(*in vitro*)에서 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나, BMP의 골형성 유도를 검정하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다. BMP들은 골기질 내에서 높은 수치로 발견이 되고 있는데, *in-vitro* 실험에서 다양한 세포들이 조골세포로 분화되도록 유도하는 효과가 밝혀졌고, 여러 동물실험을 통해 치주조직과 골조직의 재생을 유도하는 효과가 있으며, 재생된 골은 정상골과 유사하다고 보고되었다³⁰. BMP-2는 가장 활성적이며 골아세포의 분화 및 증식 기능 모두에

영향을 미쳐서 신생골의 형성을 유도할 수 있으며, 특히 최근에는 사람에서도 성공적으로 사용됨이 보고된 바 있다.

Granjeiro 등²¹의 논문에 의하면 여러 동물연구에서, 척추융합, 결손부 골재생, 골유합의 촉진, 관절 연골 병소의 치유를 증진시키는 BMP의 가능성성이 예시되었다고 하였으며, BMP의 임상 적용에 관한 연구로 요추 융합 및 고정, 경골 골절 및 비유합, 경추 원판 질환 등의 연구 논문들이 보고되어 왔다고 하였다.

Barboza 등²²은 임플란트 식립에 앞서 치조정의 높이를 증가시키기 위한 보조제로써 BMP를 사용하였으며, Bessho 등²³은 대조군의 임플란트보다 BMP를 사용한 임플란트에서 짧은 기간에 골-임플란트 접촉에서 더 큰 결합 강도를 얻는다고 보고하였다. Ren 등²⁴은 개의 대구치와 소구치의 치수에 섬유소와 결합시킨 BMP-2를 치수 복조제로 사용하여, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 로 치료한 그룹보다 1주 후의 상아질 벽 형성에서 효과적이었다고 보고하였으며, Jepsen 등²⁵은 minipig를 이용한 연구에서, rhBMP-7을 치수 복조제로 사용하여 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 로 치료한 그룹보다 rhBMP-7으로 치료한 그룹에서 상아질 벽이 더 두꺼워졌다고 하여, 치수의 광물화 유도에 효과적임을 보고하였다.

골형성에 있어서 BMP의 적용 농도는 Sigurdsson 등²⁶이 성견 치조제 상방의 수직골 형성에 0.43 mg/ml의 rhBMP-2와 교원질을 이용하여 골재생을 시도한 이래로 적절한 BMP의 적용 농도에 대한 연구가 많이 진행되었다. Kato 등²⁷의 연구에서는 적용되는 BMP의 양에 비례해 골형성이 증가했고 더 빠른 골유도가 발현되었다고 발표하였고, Tatakis 등²⁸은 서로 다른 rhBMP-2의 농도(0.05, 0.1, 0.2 mg/ml)를 Sigurdsson 등²⁶과 똑같은 실험 방법을 적용하여, 골형성에 별 차이가 없음을 발표하기도 하였다. 최근에 Jung 등²⁹이 토끼의 두개관에 행한 연구에서는 서로 다른 농도의 BMP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 적용 시, 비록 고농도 적용군이 조금 높은 골재생 효과를 보였지만, 통계적으로 유의한 차이는 없다고 하였으며, Huipin 등³⁰은 적은 농도의 BMP-2의 사용이 임상적으로 좀 더 효과적이고 안전하다고 하였으나, Liu 등³¹에 의하면 BMP의 적절한 농도는, 사용되는 대상의 종류, 연구대상의 부위, 매개체의 종류와 적용 및 분비 조건, 골재생 조건에 따라서 많은 경우의 수가 있기 때문에 일정하게 정하기는 매우 어렵다고 주장하였

다. 본 실험에서는 BMP-2의 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 사용하였다.

이러한 많은 연구에서 주목할 만한 것은 BMP의 계속적인 유지와 분비를 위한 매개체의 사용이다. Bouxsein 등³²에 의하면 ^{125}I -rhBMP-2를 토끼의 척골 결손부에 이식하고 수술 7일 후에 잔존 용량을 측정한 결과, 액체상으로 주입하였을 때는 단지 3%의 BMP만이 남아있었으나, 교원질을 사용하였을 때는 32%의 BMP가 남아있었다. 그러나 흡수성 교원질은 골내 결손부위의 골재생에는 효과적이지만, 흡수가 빠르고, 낮은 기계적 강도로 인해 공간 유지 효과가 적어, 수직 및 수평골 접대를 위한 매개체로 임상에서 사용하기는 어렵다^{33,34}.

최근에는 골과 가장 유사한 HA (HydroxyApatite)나 β -tricalcium phosphate (β -TCP)가 많이 사용되는데, 골대체재로서 HA는 흡수가 거의 되지 않기 때문에, 좀 더 빠른 흡수를 위해 β -TCP와 혼합을 하는 등의 시도가 이루어지고 있다. β -TCP는 인산 칼슘계로, 생체 내에서 분해되어 언젠가는 소멸되는 흡수성 재료이며, 골조직과 화학적으로 결합한다. TCP는 β , α , γ 의 3개의 상이 있는데, β 상은 인공치근과 골충전재로서, α 상은 높은 수화성을 이용해서 치과용 접착재로서 이용되고 있다.

Lu 등³⁵은 TCP 이식 시에 초기에는 물리적, 화학적인 용해과정이 주로 발생하여 생체분해가 이루어지다가, 점차적으로 파골세포와 식세포의 분해과정에 의해서 흡수를 보이면서 골개조 현상이 일어난다고 보고하였고, Szabo 등³⁴은 순수 β -TCP를 이식하고 6개월이 지난 후에, 일부 β -TCP의 과립이 새롭게 형성된 골에 매입되어 잔존함을 관찰하였고, 다양한 비율로 유골조직이나 연조직이 혼재되어 있었으며, 골 유형은 대부분 충판구조였다고 보고하였다. 또한, 순수 β -TCP는 생체에서 완전히 흡수되는데 보통 12-18 개월이 걸리며, 기능적 및 해부학적 측면에서 원래 골과 매우 유사한 골로 대체된다고 보고하였다.

신생골 형성에 관한 연구에서 Jensen 등³⁶은 2주차에서 자가골 이식에 의한 신생골의 형성은 $17.7 \pm 11\%$, B-TCP는 $6.3 \pm 3.2\%$ 로 큰 차이를 보였으나 4주와 8주에서는 두 그룹 간에 유의성 있는 차이는 없다고 보고하였으며, Jung 등²⁹의 연구에서는 토끼의 두개관에 행한 HA/TCP와 rhBMP-2의 골재생 비교에서 8주후의 신생골 형성이 대조군 그룹에서는 $13.96 \pm 5.98\%$, HA/TCP 적용 그룹에서는 $15.16 \pm 7.95\%$, 10 ug rhBMP-2/ml 적용 그룹에서는 $26.32 \pm 8.56\%$, 30 ug rhBMP-2 /ml 적용 그룹에서는 $30.15 \pm 7.63\%$ 로 관찰되어, 대조군과 HA/TCP 적용 그룹의 신생골 형성에 비해 rhBMP-2 적용 그룹에서는 두 배 가까운 신생골 형성을 보였으며, 또한 Bessho 등²³은 3주차 골접촉양의 연구에서 대조군에서는 $16.5 \pm 2.0\%$, BMP 10 ug과 atelopeptide type-I collagen 6 mg 적용군에서는 $81.6 \pm 0.2\%$ 로 유의성 있는 차이점을 보고한 바 있다.

본 실험의 결과에 의하면 실험1군에서는 β -TCP가 지지

체 역할을 하여 골형성 과정에서 골전도(osteoconduction) 현상을 볼 수 있었고, 실험2군에서는 골전도에 의한 신생 골의 형성과 동시에, rhBMP-2의 골유도(osteoinduction) 효과에 의한 직접적인 신생골 생성이 관찰되었다. 또한 실험 2군은 실험1군과 비교하여 골생성이 2주에서는 8.72배, 4주와 6주에서 약 1.4배 차이를 보였고, 실험1군과 실험2군의 2주에서 골형성 면적의 차이(0.10204 mm^2)가 4주 (0.09105 mm^2)와 6주(0.12874 mm^2)에서 유사한 면적 차이로 유지되는 것으로 미루어 rhBMP-2의 효과는 초기 2주에서만 유의성 있는 차이를 보이는 것으로 관찰되었다. 비탈회 골조직 시편의 형광 현미경 소견과 편광 현미경 소견을 보면, 실험1군의 8주차에서 새로 형성된 골조직 및 성숙골의 일부가 관찰되었으나, 실험2군에서는 3주차에서부터 신생골 및 일부 골조직의 충판구조가 관찰되었고, 8주차에서는 새로 생성된 대부분의 골조직이 충판구조로 이루어진 것이 관찰되어, rhBMP-2 투여군이 타 군에 비해 2-3주에서 신생골이 급속히 생성됨과 동시에 성숙골로 이행되는 소견이 관찰되어, rhBMP-2가 골의 형성 및 골개조에 관여하는 것으로 사료된다.

이상을 요약하면 β -TCP를 매개체로 사용한 rhBMP-2는 초기 2주 전후의 골형성과 3주부터 골개조에 크게 관여하는 것으로 관찰되어, 임플란트의 초기 안정 및 기능 발현, 치조골 증대술 및 상악동 골증강술 등 치과 술식에서 실제 적용을 위하여 추가적인 임상 연구가 필요하리라 생각된다.

References

- Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005;25:351-63.
- Springfield D. Aograft reconstructions. *Orthop Clin North Am* 1996;27:483-92.
- Rummelhart JM, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1989;60:655-63.
- Sculean A, Stavropoulos A, Windisch P, Keglevich T, Karring T, Gera I. Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clin Oral Investig* 2004;8:70-4.
- Hallman M, Nordin T. Sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite mixed with fibrin glue and later placement of non-submerged implants: a retrospective study in 50 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:222-7.
- Proussaefs P, Lozada J, Rohrer MD. A clinical and histologic evaluation of a block onlay graft in conjunction with autogenous particulate and inorganic bovine mineral (Bio-Oss): a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:567-73.
- Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 2005;8:292-302.
- Dunn CA, Jin Q, Taba M Jr, Franceschi RT, Bruce Rutherford R, Giannobile WV. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implants defects. *Mol Ther* 2005;11:294-9.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150: 893-9.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
- Hou LT, Liu CM, Liu BY, Chang PC, Chen MH, Ho MH, et al. Tissue engineering bone formation in novel recombinant human bone morphogenic protein 2-atelocollagen composite scaffolds. *J Periodontol* 2007;78:335-43.
- Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;346:26-37.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000;21:393-411.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1613-29.
- Saito N, Taka K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:2287-93.
- Aldinger G, Herr G, Küsswetter W, Reis HJ, Thielemann FW, Holz U. Bone morphogenetic protein: a review. *Int Orthop* 1991; 15:169-77.
- Moskow BS, Lubarr A. Histological assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant. Report of a case. *J Periodontol* 1983;54:455-62.
- Saffar JL, Colombier ML, Detienne R. Bone formation in tricalcium phosphate-filled periodontal intrabony lesions. Histological observations in humans. *J Periodontol* 1990;61:209-16.
- Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 1999;(367 Suppl):S95-106.
- Kim HJ, Choi SM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Han SB, et al. The effect of rhBMP-2 on the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Periodontal Implant Sci* 2002;32:389-402.
- Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1463-73.
- Barboza EP, Duarte ME, Geolás L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjö UM. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol* 2000;71:488-96.
- Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants *in vivo*. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:212-8.
- Ren WH, Yang LJ, Dong SZ. Induction of reparative dentin formation in dogs with combined recombinant human bone morphogenetic protein 2 and fibrin sealant. *Chin J Dent Res* 1999;2:21-4.
- Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, Tucker M, Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod* 1997;23: 378-82.
- Sigurdsson TJ, Fu E, Tatakis DN, Rohrer MD, Wikesjö UM. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:367-74.
- Kato M, Toyoda H, Namikawa T, Hoshino M, Terai H, Miyamoto S, et al. Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Biomaterials* 2006;27: 2035-41.
- Tatakis DN, Koh A, Jin L, Wozney JM, Rohrer MD, Wikesjö UM. Peri-implant bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a canine model: a dose-response study. *J Periodontal Res* 2002;37:93-100.
- Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hämmmerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implants Res* 2008;19: 188-95.

30. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:761-6.
31. Liu Y, Huse RO, de Groot K, Buser D, Hunziker EB. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res* 2007;86:84-9.
32. Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, D'Augusta D, Li X, Stevens M, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:1219-30.
33. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol* 2000;71:410-7.
34. Szabó G, Suba Z, Hrabák K, Barabás J, Németh Z. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2-and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:681-92.
35. Lu J, Descamps M, Dejou J, Kouibi G, Hardouin P, Lemaitre J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002;63:408-12.
36. Jensen SS, Broggini N, Hjørtsgård-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-TCP. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:237-43.